

*Aus der Universitäts-Frauenklinik Bern
Direktor: Prof. Dr. med. H. Guggisberg
(Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. med. W. Neuweiler)*

Prothrombinzeitbestimmung nach Soulier

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

ALICE HESS

von INWIL

(Kt. Luzern)

Publiziert in «Deutsche Med. Wochenschrift» 75, 6, 196 (1950)

1950

Graphische Werkstatt Eberhard Kalt-Zehnder, Zug

*Aus der Universitäts-Frauenklinik Bern
Direktor: Prof. Dr. med. H. Guggisberg
(Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. med. W. Neuweiler)*

Prothrombinzeitbestimmung nach Soulier

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

ALICE HESS

von INWIL

(Kt. Luzern)

Publiziert in «Deutsche Med. Wochenschrift» 75, 6, 196 (1950)

1950

Graphische Werkstätte Eberhard Kalt-Zehnder, Zug



*Auf Antrag von Herrn Prof. Dr. NEUWEILER durch die medizinische
Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.*

Bern, den 2. November 1949

*Der Dekan
der medizinischen Fakultät*

Prof. Dr. C. Hallauer

I. Einleitung

a) Allgemeines aus der Gerinnungslehre

Nach der klassischen Gerinnungslehre verläuft die Gerinnung wie folgt: Bei Verletzung eines Gefäßes wird Thrombokinase frei, sowohl aus den Blutplättchen wie aus dem verletzten Gewebe stammend. Auf noch unbekannte Weise wird Prothrombin in Thrombin umgewandelt bei Anwesenheit von Ca-Jonen.

Das Thrombin führt das lösliche Fibrinogen in das unlösliche Fibrin über, welches bei Anwesenheit der Blutproteine und mit Hilfe der Blutplättchen ein Koagulum bildet, welches die Wunde verschließt.

Morawitz formulierte die klassische Theorie der Blutgerinnung:

I. Phase: $\text{Prothrombin} + \text{Ca}^{++} + \text{Thrombokinase} = \text{Thrombin}$

II. Phase: $\text{Thrombin} + \text{Fibrinogen} = \text{Fibrin}$

Owren konnte nachweisen, daß die Gerinnungszeit des pathologischen Plasmas nach Mischung mit prothrombinfreiem Plasma sich stark der Norm näherte. Die Zugabe von gereinigtem Prothrombin hatte hingegen keinen Einfluß. Er schloß daher auf einen weiteren, im Normalplasma vorhandenen, noch unbekannten Gerinnungsfaktor, den er Faktor V nannte, oder Prothrombinase. Dieser Faktor V beschleunigt die Thrombinbildung und somit auch die Fibrinbildung. Er erfährt während des Gerinnungsablaufes eine Umwandlung in den sog. Faktor VI oder Prothrombinase. Das Klassische Gerinnungsschema kann also ergänzt werden wie folgt:

- I. Faktor V $\xrightarrow{\text{in Gegenwart von Thrombokinin} + \text{Ca}^{++}}$ Prothrombinase
(Fact. VI)
- II. Prothrombin $\xrightarrow{\text{in Gegenwart von Prothrombinase} + \text{Ca}^{++}}$ Fibrin
- III. Fibrinogen $\xrightarrow{\text{Thrombin}}$ Fibrin

b) Einzelne Gerinnungsfaktoren

1. Das Calcium und seine Rolle bei der Blutgerinnung

Das Calcium spielt eine große Rolle in den verschiedenen Phasen der Blutgerinnung. Es würde zu weit führen, in dieser Arbeit auf den Mechanismus der Calciumwirkung einzugehen. Die Auffassung, daß den Calciumionen eine katalytische Wirkung bei der Aktivierung des Prothrombins zukommt, scheint die verbreitetste zu sein. Lenggenhager fand ferner, daß ohne Ca-Jonen keine normale Gerinnungseinleitung (Überführung von Prothrombokinin in Thrombokinin [alias Thrombokinasen]) stattfindet und Fibrinogen weniger rasch durch Thrombin im Plasma ausgefällt wird.

Ca kann im Reagenzglas durch Strontium weitgehend aber nicht ebenbürtig ersetzt werden, dagegen nicht durch Barium (Lenggenhager).

2. Die Thrombokinasen

Nach der klassischen Gerinnungslehre werden die Blutplättchen als die für die normale Gerinnung des Blutes wichtigste Quelle gerinnungsaktiver Substanz angesehen. Die meisten Blutgerinnungstheorien stimmen damit überein. Das Flüssigbleiben des Blutes wird mit der Stabilität der Plättchen im strömenden Blute erklärt (Fonio). Bei der Berührung mit Fremdkörpern sollen die Plättchen zerfallen und dabei die Thrombokinasen abgeben. Eagle gibt an, daß eine vollständige Auflösung der Plättchen keine notwendige Voraussetzung für ihre thrombinaktivierende Wirkung ist. Auch gewaschene, noch geformte Plättchen oder Plättchen-Bruchstücke, die noch so groß sind, daß

man sie schnell zentrifugieren kann, sind fähig, die Blutgerinnung zu beschleunigen und sogar bei intravenöser Injektion den Tod des Versuchstieres durch intravaskuläre Gerinnung zu bewirken. Welcher Art die Veränderung ist, welche die Plättchen erleiden müssen, um «aktiviert» und dadurch fähig zu werden, Prothrombin in Thrombin zu verwandeln, ist nach E a g l e noch in völliges Dunkel gehüllt. Er weist in diesem Zusammenhang auf eine Hypothese von G o r t n e r u n d B r i g g s, nach der vielleicht die elektrischen Ladungsverhältnisse der mit dem Blut in Berührung befindlichen Flächen einen Einfluß auf die Auslösung der Gerinnung haben.

L e n g g e n h a g e r vertritt eine neue Auffassung über die Funktion der Blutplättchen.

1. Er lehnt die spezifische Bedeutung der Plättchen bei der Gerinnung ab. Die Plättchen sind ziemlich stabile Gebilde, die sich selbst im Blute und thrombinhaltigen Serum stundenlang erhalten und nicht vorgängig der Gerinnung, sondern erst längere Zeit nach erfolgter Gerinnung zerfallen. Der scheinbare Zerfall während der Gerinnung im Dunkelfeld sei ein optisches Phänomen, bedingt durch Änderung der Lichtadsorption durch das ausfallende Fibrin, analog bei Zusatz von Gelatinelösung, wo diese Erscheinung ebenfalls auftritt und reversibel ist. Die Korrektur der hämophilen Gerinnungszeit durch normale Plättchen sei ein vollständig unspezifisches Phänomen und könne durch normales, zellfreies Plasma auch erhalten werden. Ebenso können die hämophilen Plättchen im zellfreien Normalplasma die normalen Blutplättchen ersetzen im Hinblick auf die Gerinnungszeit.

2. Er anerkennt die fördernde Wirkung der Plättchen auf die Retraktion des Blutkuchens (Fonio).

3. Er schreibt den Plättchen eine besondere Affinität zu frisch ausfallendem Fibrin zu, der zu Folge sie sich im bewegten Blutstrom zusammenballen können und so z. B. eine blutende Wunde verlegen können. Er stützt diese Auffassung mit der Tatsache, daß bei der thrombopenischen Purpura die Blutungszeit verlängert, die Gerinnungszeit aber normal ist.

4. Nach Lengg enhager ist im Blute ein labiler Eiweißkörper, den er Prothrombokinin oder Prothrombokinase nennt und bei der Anwesenheit von Calciumionen, benetzbaren Oberflächen und Katalysin (Stoff der die Gerinnung fördert, ohne den resultierenden Thrombingehalt zu erhöhen) in Thrombokin (alias Thrombokinase) übergeht.

In Bezug auf die chemische Natur der Thrombokinase nimmt Morawitz ein Nukleoproteid an; Lengg enhager faßt sie als einen hitzebeständigen, eiweißähnlichen Stoff auf, der an eine Lipoidkomponente gebunden sein könne.

Auf Grund der Untersuchungen von Smith, Warner, Brinckhouse und Quick darf heute angenommen werden, daß der Thrombokinase nur die Funktion der Mitwirkung bei der Thrombinentstehung zukommt, und zwar nach Übereinstimmung der Ergebnisse von Clowes, Eagle und Mills nur bei Anwesenheit von Calcium.

3. Das Prothrombin

Das Prothrombin, dessen chemische Natur zwar noch nicht abgeklärt ist, gehört wahrscheinlich zu den Eiweißkörpern. Die Herkunft ist noch nicht einwandfrei bewiesen. Es scheint aber für die Prothrombinproduktion nur die Leber in Betracht zu kommen. Diese Auffassung stützt sich auf die Beobachtungen, daß spezifisch leberschädigende Substanzen, wie Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Phosphor eine Verminderung des Prothrombingehaltes des Blutes bewirken.

Warren und Rhoads (zit. nach Koller) fanden nach Hepatektomie bei 7 Hunden, die diesen Eingriff 4—19 Stunden überlebten, regelmäßig einen Abfall des Prothrombingehaltes. Ferner zeigten klinische Beobachtungen, daß schwere Leberparenchymschädigungen (akute, gelbe Leberatrophie) regelmäßig mit einer Verminderung des Prothrombingehaltes im Blute einhergingen.

Von besonderer Wichtigkeit ist der Nachweis, daß bei der Entstehung von Prothrombin das Koagulationsvitamin K notwendig ist. Stützend sind hier die Versuche von Dam, Clavind, Lewis und Tage-Hansen bei einem K-avitaminotischen neugeborenen Huhn.

4. Fibrinogen und Fibrin

Fibrinogen ist ein globulinartiger Eiweißkörper. Über die chem. Beziehung von Fibrinogen zu Fibrin herrschte früher die Ansicht, daß es sich nur um zwei Zustandsformen ein und desselben Proteins handle. Diese Ansicht wurde widerlegt durch die Versuche von **Abderhalden** und **Buadze**, denen es gelang, Fibrinogen und Fibrin durch die **Abderhaldensche Abwehrfermentsreaktion** zu unterscheiden. Ferner fanden **Diebold** und **Jühlin**, daß das durch Thrombin gebildete Fibrin ebenso wie das durch Hitzeeinwirkung aus dem Fibrinogen gebildete Denaturationsprodukt (**Hitzefibrin**) im Gegensatz zum genuinen Fibrinogen, die für die denaturierten Proteine kennzeichnende **Nitroprussidreaktion** ergeben.

Nähere Angaben über die chemischen Unterschiede von Fibrinogen und Fibrin werden bis heute nicht gemacht.

II. Klinische Bedeutung der Prothrombinzeitbestimmung

Die Bestimmung der Prothrombinzeit spielt für den Kliniker eine bedeutende Rolle. So bei der Erfassung von **Hypoprothrombinaemien**, die sich in extremen Fällen als hämorrhagische Diathesen äußern und die bei folgenden Krankheiten gefunden worden sind:

1. Bei den sog. **Resorptions-K-Avitaminosen**, zu denen der mech. Stauungsikterus, Gallenfisteln, **Hertersche Krankheit**, **Sprue (Koller)** und gewisse chronische Darmstörungen (**Abbott** und **Holden**) gehören.

2. Bei **Leberparenchymerkrankungen**, wie **Lebercirrhose**, **akute Leberatrophie**. Je nach dem Grade der Leberstörung bewirkt **Vit-K-Zufuhr** keine oder nur mangelhafte Verkürzung der Gerinnungszeit, weil hier die das Prothrombin bildenden Zellen selbst geschädigt sind. (**Koller**)

3. Bei der **transitorischen Hämophilie der Neugeborenen** (**Brinckhouse, Smith u. Warner**). Der schon physiologischerweise

bei der Geburt bestehende Mangel an Prothrombin vermehrt sich in den ersten Lebenstagen (Fiechter, Koller), was wohl auf ein noch nicht genügendes Funktionieren der Leber, wie auf ein Defizit an Vit. K zurückzuführen ist.

4. Bei schwerer Tuberkulose wurde ferner auch eine Hypoprothrombinaemie beobachtet, welche sich möglicherweise als leichten Leberschaden deuten läßt.

5. Es wurde ferner eine Verlängerung der Prothrombinzeit bei Hyperemesis gravidarum gefunden (Neuweiler und Boehringer) und zwar um so stärker, je schwerer die Erkrankung war, was mit der toxischen Leberschädigung erklärt wird. Wie in der Erfassung und im Verlaufe von gewissen Krankheiten, so hat die Prothrombinzeitbestimmung auch im Bereiche der Therapie mit gerinnungshemmenden Mitteln ihre Bedeutung, wodurch eine gewisse Steuerbarkeit erzielt werden kann.

Es kommt dies in Frage bei der Prophylaxe von postoperativen Thrombosen und Embolien, bei Behandlung von Thrombophlebitiden, Coronarthrombosen etc.

III. Methoden zur Bestimmung des Prothrombingehaltes

Bei den Methoden, die in der Klinik Eingang gefunden haben, wird die Gerinnungszeit bestimmt und von dieser auf den Prothrombingehalt geschlossen. Da die Gerinnungszeit aber nicht allein vom Prothrombingehalt abhängig ist, müssen besondere Bedingungen erfüllt sein, daß aus der Dauer der Gerinnung direkt Schlüsse auf den Prothrombingehalt gezogen werden können.

1. Methode nach Dam und Clavind

Das Verfahren beruht auf dem Nachweis des «Gerinnungsvermögens» des Plasmas bei Zusatz von verschiedenen Konzentrationen einer Thrombokinaselösung. Es wird also nicht direkt das Prothrombin, bzw. die «Prothrombinzeit» bestimmt, sondern

ein Quotient $R = \frac{K}{K_n}$, wobei K die Konzentration der ThrombokinaseLösung bedeutet, die eine Gerinnung des zu untersuchenden Plasmas in 3 Minuten ermöglicht, K_n die Thrombokinasekonzentration, die ein normales Plasma in derselben Zeit zur Gerinnung bringt. Je größer R um so schlechter das Gerinnungsvermögen und umgekehrt. Nach Schönhayder ist der R-Wert ein indirektes Maß für den Prothrombingehalt.

Ausführung der Bestimmung: Das Blut wird mittels einer mit flüssigem Paraffin ausgespritzten Nadel aus der Armvene entnommen und in paraffiniertem Zentrifugierröhrchen mit einer Marke bei 4 ccm aufgefangen. Jedes Röhrchen enthält 0,2 ccm einer Heparinlösung. Die Konzentration einer Heparinlösung wird so bemessen, daß das Blut bis zur Ausführung der Gerinnungsbestimmung flüssig bleibt. Die Menge des zugesetzten Heparins darf jedoch nicht zu groß sein, da sonst das Plasma selbst durch die stärksten Thrombokinasekonzentration nicht mehr zum Gerinnen gebracht werden kann. Hat das Blut die Marke 4 ccm erreicht, so wird die Nadel herausgezogen und das Röhrchen vorsichtig geschüttelt, auf Eis gekühlt und dann 5 Minuten lang zentrifugiert. Eine Abtrennung der Blutplättchen ist nicht notwendig. Das Plasma wird darauf in ein anderes paraffiniertes Röhrchen abpipettiert und auf Eis gestellt. Das auf diese Weise gewonnene Plasma wird zu gleichen Teilen mit Ringerlösung verdünnt; davon werden je 4 Tropfen (= 0,2 ccm) mittels Tropfpipetten in mehrere Mikroglasröhrchen von 6 mm Lumen und 38 mm Höhe gegeben und die Röhrchen in den Gerinnungsapparat von Fischer gestellt. Darauf wird pro Mikroröhrchen je ein Tropfen (= 0,05 ccm) einer Thrombokinaseverdünnung zugefügt, der Gerinnungsapparat geschlossen und in ein Wasserbad gestellt von der konstanten Temperatur von 38—39°. Alle 15 Sekunden wird der Apparat rotiert und der Zeitpunkt festgestellt, in dem der Inhalt der Röhrchen zu einer festen Masse geronnen ist. Dadurch, daß verschiedene Konzentrationen von Thrombokinase verwendet werden, ist es leicht, diejenige Konzentration herauszufinden, welche die Gerinnung in 3 Minuten zustande bringt. Diese Konzentration wird mit K bezeichnet. Ist die Konzentration bei Untersuchung von normalen Plasma = K_n so bedeutet der Quotient $R = \frac{K}{K_n}$ ein Maß für die Abweichung

des Gerinnungsvermögens von der Norm. Der Normalwert von R ist = 1. Werte zwischen 0,5 und 0,2 dürfen ebenfalls noch zur Norm gerechnet werden.

2. Methode nach Warner, Brinckhouse und Smith

Diese Methode ermöglicht, den Prothrombingehalt direkt in Prozenten der Norm auszudrücken.

Erforderliche Lösungen:

1. Oxalat-NaCl-Lösung: 0,075 g Na-Oxalat in 100 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung aufzulösen.

2. Thrombokinese, hergestellt durch Extraktion von 0,3 g durchgespülter, getrockneter Hundelunge mit 10 ccm physiologischer NaCl-Lösung; kurz zentrifugieren. Verwendet wird die überstehende Flüssigkeit.

3. Oxalatplasma: Blutentnahme durch Venenpunktion mittels paraffinierter Spritze. Das Blut wird in ein Hämatokritröhrchen von 15 ccm übergeführt, in welchem sich 2 ccm einer 1,5%igen Na-Oxatlösung befindet. Zentrifugieren von 30 Minuten bei einer Tourenzahl von 3000; darauf wird das Volumen des Plasmas gemessen und daraus die durch den Oxalatzusatz erfolgte Verdünnung berechnet.

4. Die Fibrinogenlösung: Das Oxalatplasma wird durch Zusatz von $\frac{1}{3}$ seines Volumens gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt, der Niederschlag in Oxalat-Na-Cl-Lösung aufgelöst und zwar in einer dem Ausgangsvolumen identischen Menge. Mehrmaliges Wiederholen des Ausfällens und der Wiederauflösung. Schließlich wird der Niederschlag in $\frac{1}{3}$ des ursprünglichen Oxalat-Na-Cl-Volumens aufgelöst. Dialyse gegen Oxalat-Na-Cl-Lösung im Eisschrank während 90 Minuten.

5. Ca-Lösung: 0,5 g CaCl_2 und 0,525 g NaCl werden in 100 ccm Wasser aufgelöst.

6. Als Heparin wurde von den Autoren ein Handelsprodukt von Hynson, Westcott und Dunning verwendet.

Aus dem Oxalatplasma wird das Fibrinogen dadurch entfernt, daß man Thrombin in Form von frischem Serum zusetzt und das entstandene Fibrin durch zentrifugieren entfernt. Es bleibt im Plasma also nur noch Prothrombin zurück. Von diesem fibrinogenlosen Plasma werden eine Reihe von Verdünnungen hergestellt. Durch diese Verdünnung wird die Wirkung gerinnungshemmender Substanzen praktisch ausgeschaltet. Nun wird durch Zusatz von Ca und Thrombokinese im Überschuß das Prothrombin in Thrombin umgewandelt. Nach genügend langer Einwirkung dieser Gerinnungsfaktoren wird die speziell zu diesem Zwecke hergestellte Fibrinogenlösung zugesetzt und die Zeit gemessen bis die Gerinnung eintritt. Es wird von den verschiedenen Verdünnungen des Prothrombins diejenige festgestellt, welche die Gerinnung in 15" zustande bringt. Ein Plasma, welches in unverdünntem Zustande in 15" gerinnt, enthält eine Einheit Prothrombin.

3. Methode nach Quick

Da die Gerinnungszeit außer vom Prothrombingehalt auch vom Ca und von der Thrombokinese abhängig ist, werden die beiden letzten Faktoren konstant gehalten.

Ausführung der Quickschen Methode wie sie in vorliegender Arbeit gehandhabt wurde:

Das Blut wurde durch Venenpunktion mittels einer Rekord-spritze entnommen, in die zunächst 0,2 ccm sterile Natriumoxalat-lösung eingesaugt wurde. Das Blut wurde bis auf 2,0 ccm aufge-zogen. Dann wurde durch mehrmaliges Neigen der Spritze rasch gemischt. Bei 3000 Umdrehungen in der Minute wurde das Oxalatblut während 15 Minuten zentrifugiert und das überste-hende Plasma mit einer Pipette abgehebert. 0,1 ccm des abge-heberten Plasmas wurde in ein Reagenzgläschen von 13 mm Weite und ca. 1,5 cm Länge pipettiert und dann in ein Wasserbad von 38° gestellt. Nach 5 Minuten wurde 0,1 ccm der Thromboki-naseaufschwemmung zu dem im Wasserbade befindlichen Plasma (0,1 ccm) gebracht und ca. 1 Minute dort gelassen. Nun wurde von der ebenfalls im Wasserbade vorgewärmten Calciumchloridlösung (0,548 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ auf 100 ccm Aq. Dest.) 0,1 ccm in das

Plasma-Thrombokinasegemisch pipettiert und gleichzeitig die Stoppuhr in Gang gebracht. Mit einem vorher ausgeglühten Platindraht wurde alle Sekunden durch das Gemisch gefahren, und beobachtet, bis der erste Fibrinfaden am Platindraht hängen blieb. Dieser Zeitpunkt wurde mit der Stoppuhr abgelesen. Die erhaltene Zeit in Sekunden entspricht der Prothrombinzeit.

4. Die Methode von Fiechter

Sie wurde auf die Quicksche Methode aufgebaut und als Mikromethode speziell zur Untersuchung von Neugeborenen ausgearbeitet. 0,15 ccm Blut wird durch Schnepferstich gewonnen und in einer besonders geeichten Pipette mit Oxalat 1 : 10 gemischt. Damit schon in der Pipette eine Mischung möglich ist, besitzt diese eine Erweiterung ähnlich derjenigen der Leukozytenpipette. Das Oxalatblut wird hierauf in Glasschälchen von ca. 15 mm Durchmesser gespritzt, das in einem Wasserbad von 38° hängt. Dazu gibt man analog der Quickschen Gerinnungsbestimmung 0,15 ccm Thrombokinasenaufschwemmung, sowie 0,15 ccm CaCl-Lösung und mißt die Zeit mit der Stoppuhr von dem Momente an, wo das ganze CaCl mit dem Blute in Berührung kommt bis zur Bildung eines kleinen Klümpchens. Bei dieser Methode besteht die Gefahr, daß bei langsamem Hervorsickern des Blutes, wie das bei Neugeborenen öfters der Fall ist, die Spontangerinnung schon beginnt, bevor das Blut mit dem Oxalat in Berührung kommt, besonders, wenn man veranlaßt ist, stark zu pressen, wobei viel Gewebsthrombokinas mitkommt. Bei vorherigem Durchspülen der Pipette mit Oxalat trat jedoch eine frühzeitige Spontangerinnung weniger häufig auf.

Da die Ausführungen der genannten Methode schwer zu erlernen, eine gute Apparatur und geübtes Personal voraussetzt und daher für vorgängig erwähnte klinische Reihenuntersuchungen zu kompliziert sind, hatte man begreiflicherweise das Bedürfnis nach einfacheren Methoden. Eine solche hatte Soulier in seiner Objektträgermethode angegeben, die am Krankenbett ausgeführt werden kann und auf welche in dieser Arbeit näher eingetreten werden soll.

IV. Eigene Untersuchungen

1. Zweck

Die Ergebnisse der Soulier'schen Mikromethode sollen mit Hilfe der Prothrombinzeitbestimmungen nach Quick und Fiechter nachgeprüft werden.

2. Technik

Ausführung der Soulier'schen Methode

Auf einem gut entfetteten*) Objektträger wird ein Tropfen (0,02 ccm) einer Thrombokinaselösung, daneben ein doppelt so großer Blutropfen (Schnepferstich aus der Fingerbeere oder aus dem Ohrläppchen entnommen) gebracht, dann werden sofort mit einem feinen Glasstäbchen die beiden Tropfen gut miteinander vermischt, so daß die Fläche der Tropfen auf das 3-fache vergrößert wird.

Die Koagulationszeit wurde beobachtet, während dem die Blutthrombokinasemischung durch regelmäßiges Schaukeln des Objektträgers bewegt wurde. Plötzliches Stillstehen des Tropfens bedeutet das Ende der Koagulationszeit und wurde mit der Stoppuhr gemessen. Beginn der Koagulationszeit bei der Berührung des Blutes mit der Thrombokinaselösung; jede Bestimmung wurde zweimal wiederholt und der Mittelwert errechnet. Sie wurde bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Es wurde eine «extra starke» Thrombokinaselösung der Firma Hoffmann-La Roche und die sich im Handel befindliche Thrombokinaselösung «Roche» der selben Firma verwendet. Es ist hervorzuheben, daß bei der Soulier'schen Methode Nativblut verwendet wird, ohne vorherige Entkalkung und zusätzliche Calciumzufuhr. Da Hypocalcaemie (Tetanie) bisher nicht als Ursache für haemorrhagische Diathese bekannt ist (Koller, Letulle und Mathé), kann das Calcium hier vernachlässigt werden.

*) Objektträger lassen sich leicht entfetten in einer Lösung von Alkohol und Äther (1 : 1).

Kürzlich wurde an der med. Universitätsklinik Zürich eine Abart der Soulierschen Methode durchgeführt. An Stelle des Objektträgers wurde ein Uhrglas verwendet auf welches man aus der Fingerbeere einen Blutropfen zu einem ungefähr gleichgroßen Tropfen Thrombokinase-Lösung fallen ließ und die beiden mittels einer Platinöse vermengte. In vorliegender Arbeit wurde aber vorgezogen nach Soulier das Blut mittels Pipette zu entnehmen, um so mit konstanten Blutmengen arbeiten zu können.

Herstellung der Thrombokinase-Lösung

Der Inhalt einer Ampulle Thrombokinase (100 mg) wurde mit 3 ccm physiologischer NaCl-Lösung gemischt und während 15 Minuten unter mehrmaligem Aufschütteln in ein Wasserbad von 50° gestellt. Die so entstandene Suspension wurde dann durch dreifache Gaze filtriert. Das nun gebrauchsfertige Filtrat wurde bei Ausführung der Quickschen Methode in ein Wasserbad von 38° gebracht, für die Methode nach Soulier bei Zimmertemperatur gelassen. Da die gebrauchsfertige Lösung ihre Wirksamkeit nur eine beschränkte Zeit behält (einige Stunden), wurde bei mehreren Prothrombinbestimmungen am gleichen Tag ein Teil der Lösung im Kühlschrank aufbewahrt.

Versuchsreihen

A. Einzelbestimmungen an verschiedenen Normalpersonen

Zweck: Die Methoden nach Soulier und nach Quick wurden verglichen:

1. Bezüglich der Schwankungsbreite der Einzelwerte bei gleichem Prothrombingehalt.
2. Bezüglich Differenz der Mittelwerte bei gleichem Prothrombingehalt.

Vorgehen: Jede Bestimmung wurde zweimal vorgenommen und der Mittelwert daraus errechnet: war die Abweichung der 2. Bestimmung groß, wurde noch ein dritter Wert ermittelt.

Ergebnis:

Versuchspers.	Mittelwert nach Quick	Schwankung	Mittelwert nach Soulier	Schwankung
No. 1	18,5	(17—18)	22"	(21 — 23)
No. 2	16	(0)	22,75	(22,5—23)
No. 3	14,5	(14—15)	23"	(22 — 24)

Wie aus der Zusammenstellung ersichtlich ist, liegen die Mittelwerte nach Soulier höher als jene nach Quick. Die Schwankungen der Einzelwerte nach Soulier sind gering. Es ist hervorzuheben, daß bei starkem Hervorpressen des Blutes, wobei dem Blute vermehrt Gewebsthrombokinasen beigemischt wird, Schwankungen bis zu 5" entstehen können, was veranlaßt, mit dem Schnepfer möglichst tief zu stechen oder bei schlechtem Bluten den Schnepferstich zu wiederholen, wodurch solche Fehlresultate vermieden werden können.

B. Verdünnungsreihe mit physiologischer NaCl-Lösung,

wie sie von Quick angegeben wurde, um die Prothrombinkonzentration des zu untersuchenden Plasmas in Prozenten der Norm angeben zu können.

Zweck: Man will den Verlauf der nach den verschiedenen Methoden ermittelten Kurven beobachten, welcher bei analoger Sensibilität der Methoden parallel sein soll.

Vorgehen: Aus dem zu untersuchenden Plasma wurden 11 verschiedene Verdünnungen mit physiologischer NaCl-Lösung hergestellt, deren Prothrombingehalt nach Quick bestimmt wurde. Beim unverdünnten Normalplasma wurde der Prothrombingehalt als 100% angenommen, bei der zehnfachen Verdünnung mit 10%. Auf der Ordinate wurden die Prothrombinzeiten, auf der Abszisse die Verdünnungen in Prozenten angegeben. Wie schon Quick und später auch Koller festgestellt haben, ist ersichtlich, daß die Beziehung zwischen Prothrombinzeit und Prothrombingehalt nicht linear ist. Bei Verdünnung des Normalplasmas auf die Hälfte, zeigt die Prothrombinzeit nur eine geringe Verlängerung, erst bei einer Verdünnung von 20% ist eine deutliche Verlängerung festzustellen. Die Kurve kann als Stan-

dard für die Bestimmung des Prothrombingehaltes bei gegebener Prothrombinzeit dienen. Sie hat aber nur Gültigkeit bei einer Thrombokinase, die ebenso aktiv ist, wie die in vorliegender Arbeit verwendete.

2. Es wurde aus dem Fingerbeerenblut der gleichen Versuchsperson, zur gleichen Zeit und unter gleichen Bedingungen eine analoge Verdünnungsreihe hergestellt und der Prothrombingehalt der einzelnen Verdünnungen nach Soulier bestimmt, wie es vorgängig beschrieben wurde.

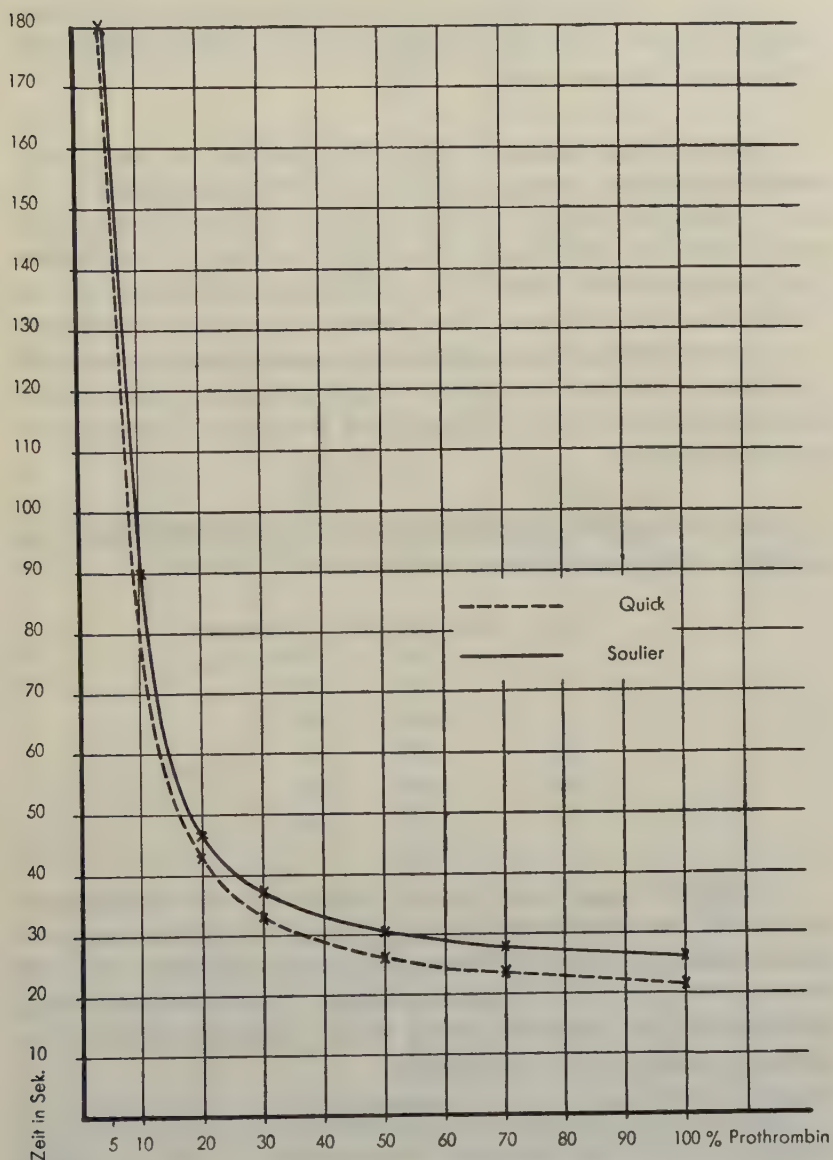
Ergebnis: Es ist aus Abb. 1 zu ersehen, daß die beiden Kurven bis zu einer Verdünnung von 25% parallel verlaufen und dann bei höheren Verdünnungen mit 10% und 5% Prothrombingehalt zusammenfallen. Analoge Resultate ergeben sich bei Verwendung der Thrombokinase «Roche» (Abb. 1a).

Verdünnungsreihe mit physiologischer NaCl-Lösung (Abb. 1a)

(Ausgeführt mit Thrombokinase «Roche» Z. T. 18° C.)

Prothrombinmenge in %	Prothrombinzeit in Sekunden	
	Soulier	Quick
100%	38"	34"
70%	40"	36"
50%	42"	38"
30%	48"	43"
20%	57"	53"
10%	105"	105"
5%	200"	200"

Verdünnungsreihe mit physiologischer NaCl-Lösung (Abb. 1)
(Ausgeführt mit Thrombokinase «extra stark» Z. T. 18° C.)



C. Bestimmung der Prothrombinzeit bei Belastung mit Tromexan (Geigy)

Zweck: Die Empfindlichkeit der Soulierschen Methode auf kritische Werte des Prothrombinspiegels wurde nachgeprüft (Werte zw. 10% und 30%).

Ausführung: Es wurde die Prothrombinzeit vor der Tromexanverabreichung sowohl nach Quick wie auch nach Soulier bestimmt (Abb. 2 und 2a). Dann wurde dreimal eine Tablette Tromexan, verteilt auf einen Tag, verabreicht. Am zweiten Tag erfolgte wieder eine Prothrombinzeitbestimmung und es wurde wiederholt dreimal eine Tablette Tromexan verabreicht.

Als am dritten Tag ein deutlicher Anstieg der Prothrombinzeit festzustellen war, wurde die Tromexanverabreichung sistiert und durch weitere Bestimmungen der Abfall der Tromexanwirkung beobachtet.

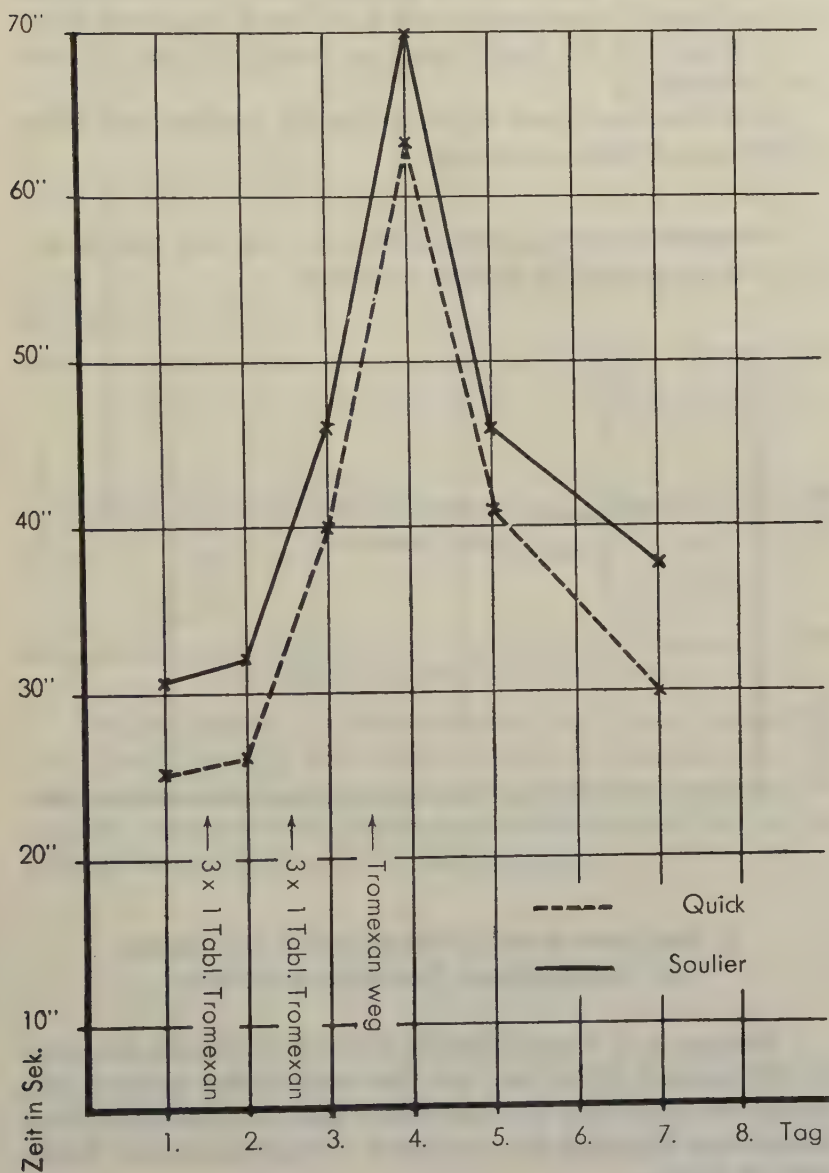
Prothrombinzeitbestimmungen bei Tromexanbelastung. Ausgeführt mit Thrombokinase «extra stark». (Abb. 2a)

Tage	Prothrombinzeit in Sekunden	
	Soulier	Quick
1.	24"	15,5"
2.	29"	18,5"
3.	55"	43"
6.	26"	18"
7.	24"	16"

Ergebnis: Abb. 2 und Abb. 2a zeigen, daß der Anstieg wie der Abfall der Tromexanwirkung mit der Soulierschen und mit der Quickschen Methode übereinstimmend registriert wird. Es wurden bei mehreren Versuchspersonen Tromexanbelastungen durchgeführt in analoger Weise, wobei übereinstimmende Resultate festgestellt werden konnten.

Zum Teil wurde die sich im Handel befindliche Thrombokinase «Roche» verwendet, z. T. die «extra starke» Thrombokinase der Firma Hoffmann-La Roche, wie es jeweils bei den entsprechenden Abbildungen vermerkt wird.

Prothrombinzeitbestimmungen bei Tromexanbelastung (Abb. 2)
(Ausgeführt mit Thrombokinase «Roche»)



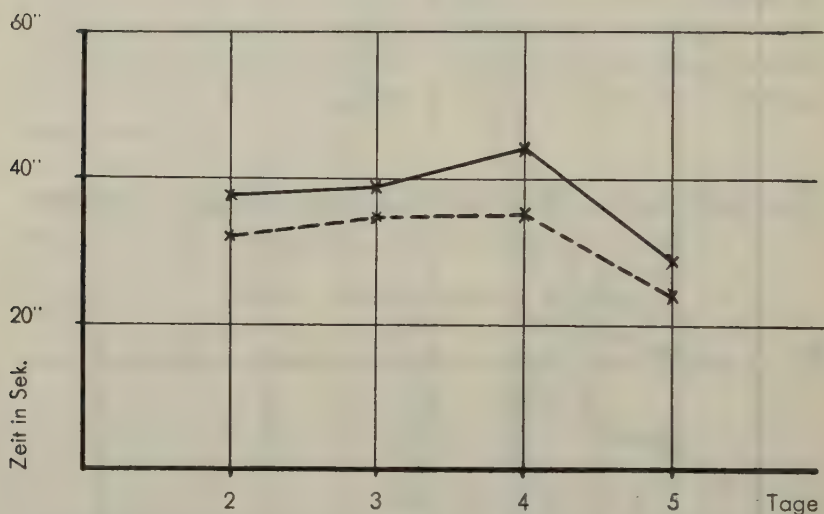
D. Bestimmung der Prothrombinzeit bei Neugeborenen

(Abb. 3) Bei angeführtem Beispiel wurde die Prothrombinzeit bei einem Neugeborenen vom 2. bis zum 5. Tag nach Soulier bestimmt. Als Kontrollmethode wurde die von Fiechter ausgeführt.

Als Thrombokinase wurde die «extra starke» der Firma Hoffmann-La Roche verwendet.

Ergebnis: Aus Abb. 3 ist zu ersehen, daß auch hier die beiden Kurven annähernd parallel verlaufen.

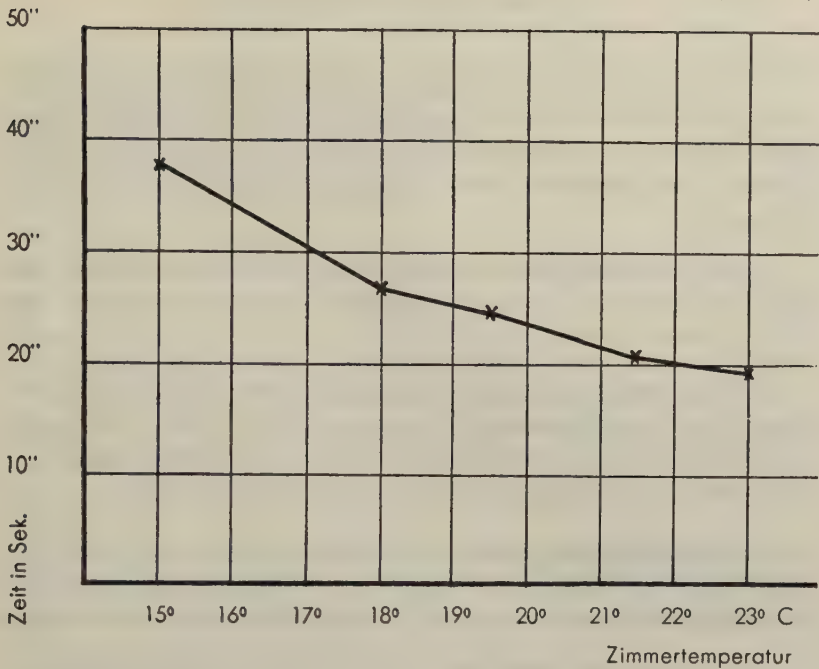
(Abb. 3)



E. Bestimmung der Prothrombinzeit nach Soulier bei verschiedenen Zimmertemperaturen

Wie aus Abb. 4 ersichtlich ist, tritt die Gerinnung bei höherer Temperatur früher ein, wie dies auch in den Arbeiten von Soulier erwähnt wird. Es muß daher eine Reihenuntersuchung beim selben Patienten bei konstanter Zimmertemperatur durchgeführt werden.

(Abb. 4)



3. Ergebnis der gesamten Untersuchung

Aus zahlreichen, bei verschiedenen Bedingungen ausgeführten Versuchen, geht eine Zuverlässigkeit der Soulierschen Methode hervor, die jener der Quickschen Methode nahe kommt.

Ein entscheidender Nachteil der Soulierschen Methode ist ihre Abhängigkeit von der Zimmertemperatur.

V. Zusammenfassung

1. Es wurde eine vereinfachte Mikromethode zur Bestimmung der Prothrombinzeit ausgeführt, wie sie von Soulier angegeben wurde. Die Bestimmungen wurden bei Zimmertemperatur gemacht mit Nativblut, ohne vorherige Entkalkung und Rekalzifikation.

2. Zur Prüfung der Zuverlässigkeit der Soulierschen Methode wurden als Kontrollmethoden jene von Quick und Fiechter verwendet.

3. Es wurden mehrere Einzelbestimmungen an Normalpersonen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, wie auch Bestimmungen bei Verdünnungsreihen mit physiol. NaCl-Lösung, bei Tromexanbelastungen und bei Neugeborenen.

4. Fehlerquellen, welche die Methode in sich birgt (Abhängigkeit von der Zimmertemperatur, Verkürzung der Prothrombinzeit bei starkem Herauspressen des Blutes) wurden erörtert.

5. Vorliegende Resultate sprechen für die Verwendbarkeit der Soulier'schen Methode in der Klinik.

Literaturangaben

- Abbott, W. E. und Holden, W. D., Amer. J. Surg. 1941, Bd. 53, S. 215—218
- Aberhalden und Buadze, zit. nach Wöhlisch
- Clowes, Eagle und Mills, zit. nach Wöhlisch
- Dam und Clavind, zit. nach Koller
- Diebold und Jühlen, zit. nach Wöhlisch
- Fonio zit. nach Lenggenhager
- Fiechter, Schw. Med. Wschr. 70, 259, (194)/Msch. Geburt. 111. 1 (1940)
- Gortner und Briggs, zit. nach Wöhlisch
- Howell, W. H., Am. J. Physiol 35, 474, (1914)
- v. Kaulla und Pulver: Tierexperimentelle Untersuchungen mit dem neuen Antithrombotikum Tromexan. Schw. med. Woch. Schr. 78, 806, 1948
- Koller, F.: Das Vitamin K und seine klinische Bedeutung. Georg Thieme. Leipzig 1941
- Koller und Frick: Die Differenzierung der Prothrombinzeit nach Quick Diss. 1948
- Lenggenhager, K.: Weitere Fortschritte in der Blutgerinnungslehre. Georg Thieme. Stuttgart 1949
- Letulle et Mathé: Dosage pratique de la Prothrombine par la Microméthode de J. P. Soulier, Presse médicale 630. 1947
- Morawitz: zit. nach Koller
- Neuweiler und Boehringer-Scherb: Die Prothrombinzeit während Schwangerschaft, Geburt und Wochenbett, Diss. 1943
- Neuweiler und Schwab: Thrombokinas zur Prothrombinzeitbestimmung aus Placentagewebe. Diss. 1947
- Owren: zit. nach Koller und Frick
- Pedrazzini, Salvidio und Koller: Schw. med. Wochenschr. 19, 428 (1949)
- Pulver und von Kaulla: Über Resorption und biologische Inaktivierung des neuen Antithrombotikums Tromexan. Schw. med. Wochenschr. 78, 956, 1948
- Quick: zit. nach Koller
- Reinis und Kubik: Klinische Erfahrungen mit einem neuen Praep. der Cumarinreihe. Schw. med. Wochenschr. 78, 785, 1948
- Smith, Warner, Brinckhouse und Quick: zit. nach Koller
- Soulier, J. P.: La Prothrombine et la Vitamine K. Le sang. 1946, vol. 17
- Warren und Rhoads: Amerr. J. med. Sci 198, 193 (1939)
- Warner, Brinckhouse und Smith: Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 37, 628 (1938)

